

综 述

纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展

方诩^{1,2}, 秦玉琪^{1,2}, 李雪芝^{1,2}, 王禄山¹, 汪天虹¹, 朱明田^{1,2}, 曲音波^{1,2}

1 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

2 山东大学 国家糖工程技术研究中心, 济南 250100

摘 要: 利用纤维素酶将预处理后的秸秆降解成可发酵性单糖, 然后发酵生产所需的液体燃料及化工产品的技术, 对于我国解决能源、环境、人口就业等难题有着巨大的积极影响。在木质纤维素生物降解转化工艺中, 减少纤维素酶用量及提高酶解效率是降低木质纤维素降解成本的关键。纤维素酶系和木质纤维素酶水解技术的改进需要深入了解纤维素酶系统的组成及其协同作用、纤维素酶的结构与功能以及纤维素酶的生产技术。将就以上几个方面的研究进展进行讨论, 并深入探讨了纤维素酶糖化能力的评价方法。

关键词: 纤维素酶, 木质纤维素类生物质, 纤维素酶解

Progress on cellulase and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass

Xu Fang^{1,2}, Yuqi Qin^{1,2}, Xuezhi Li^{1,2}, Lushan Wang¹, Tianhong Wang¹, Mingtian Zhu^{1,2}, and Yinbo Qu^{1,2}

1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

2 National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: Biofuels and bio-based chemicals from lignocellulosic biomass are sustainable, making them alternatives to petroleum-derived fuels and chemicals to address the challenges of the shortage of crude oil supply and climate change resulted from the overconsumption of petroleum-based products, particularly in China. However, high cost in liberating sugars from lignocellulosic biomass is still the bottleneck of the commercialization of biofuels and bio-based chemicals. In this article, the major components of cellulases and their synergistic role in the hydrolysis of pre-treated biomass is reviewed, followed by how to evaluate the enzymatic hydrolysis. With the elucidation of the underlying mechanism of the conformations of the enzyme molecules and their effectiveness in attacking cellulose substrate, more efficient enzymes are expected to be developed. Using the high production strain *Penicillium decumbens*, the on-site production of cellulases for cellulose ethanol production is discussed.

Keywords: cellulases, lignocellulosic biomass, cellulolytic enzymes

进入 21 世纪以来, 人类在能源、资源、环境等方面面临着越来越严峻的挑战。中国的问题特别突

出: 一方面, 中国的石油对外依存度已经过半, 大部分石油消费要靠进口, 国家的能源安全和经济安

Received: May 20, 2010; **Accepted:** June 23, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2006AA020201, 2007AA05Z455), Independent Innovation Foundation of Shandong University (No. 2009DX002).

Corresponding author: Yinbo Qu. Tel: +86-531-88365954; Fax: +86-531-88565234; E-mail: quyinbo@sdu.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2006AA020201, 2007AA05Z455), 山东大学自主创新基金 (No. 2009DX002) 资助。

全无法得到保证;同时,大量使用矿石燃料又严重污染环境,中国已经成为最大的温室气体排放国之一,面临国际上巨大的减排压力。寻找替代石油的可再生资源已成为紧迫任务。生物质资源是可以大量再生的,其利用过程中产生的 CO₂ 又会被植物吸收,形成碳封闭循环,不会影响环境。随着石油资源的日益短缺,利用工业生物技术将生物质快速转化为液体燃料和化工产品,经过充分利用后再排放,将形成新的封闭循环,实现人类社会的持续发展。因而,化学工业已经开始逐步形成由石油资源向生物质资源的历史性、革命性转变。

目前的生物燃料和大宗生物化学品主要是由淀粉、糖和油脂来生产的,从而存在“与人争粮、与粮争地”的问题,因而备受争议。中国人口多、土地和水资源有限,保障粮食安全始终是国家的首要任务,必须发展以非粮原料,特别是以植物生物质主体(细胞壁)的木质纤维素部分来进行生物产品生产。木质纤维素的3类主要组分的单体是各种糖和芳香族化合物,都可望用来生产液体燃料和化工产品。因而,生物化工产业的原料也面临实现由粮油原料向纤维素原料的历史性、革命性转变。

美国政府通过立法形式为自己规定了必须实现的目标:2022年要生产360亿加仑可再生燃料,其中约半数要靠纤维素乙醇;2030年要用可再生燃料来替代30%的液体石化燃料。为实现上述目标,美国政府加大了相应的投资力度:2007年宣布投资10余亿美元,包括:投入3.75亿美元同时建立3个生物能源研究中心,吸引一流大学和研究机构参与相关的基础研究,同时,投资3.85亿美元,吸引企业1:2匹配,总投资12亿美元,用于6个万吨级以上的纤维素生物炼制厂建设。2009年以来,尽管美国面临严重的经济危机,新任能源部长朱棣文仍宣布从经济复苏计划中追加近8亿美元用于先进生物燃料研发和产业化,希望利用发展新能源来保住自己的超级大国地位。

在美国政府的大力支持下,相关技术已取得很大进展。在很低用酶量(15 FPA IU/g 葡聚糖)前提下,纤维素和半纤维素的得糖率均可>90%。每加仑纤维素乙醇的成本也已于2001年的大于5美元/加

仑,降到了目前的约2美元/加仑,接近了实用要求。其中最为显著的是提高了酶解效率,使单位乙醇产品用酶的成本已降到约0.2美元/加仑。

我国的作物秸秆并未得到有效利用,在收获季节常常就地焚烧,造成严重的环境污染,成为一大社会公害,急需寻找新的高效利用途径。而解决该问题最有前景的方案之一正是降解秸秆转化成可发酵性糖,再通过发酵生产人类所急需的液体燃料及化工产品^[1-2]。

从秸秆等木质纤维素提炼乙醇等化工产品,首先必须采用酸或酶水解法将木质纤维素转化成可发酵性单糖。酸水解法的产糖率往往低于60%,且酸水解过程中会产生大量的发酵抑制物,加上设备投资较高和环境负担过大等问题,所以难以大规模产业化。同酸法水解工艺相比,酶法水解具有反应条件温和、环境友好、产物专一、糖得率高(转化率>90%)和设备投资低等优点,所以成为世界各国重点研发的热点之一。酶水解法首先要采用有效的物理化学预处理打破由纤维素、半纤维素和木质素等高分子相互结合形成的天然屏障,然后利用纤维素酶将预处理后的木质纤维素降解成可发酵性单糖。国内已先后建成了多套纤维素生物转化试验装置,但由于技术积累不够,生产成本过高(每吨乙醇的生产成本7000元以上),无法真正实现工业化。造成木质纤维素降解成本过高的主要技术瓶颈是水解过程的纤维素酶用量较高,酶解效率有待改进^[3]。

为了减少生产中的纤维素酶用量并提高酶水解效率,降低工业生产中纤维素酶的成本,世界各国科学家围绕纤维素酶和木质纤维素的生物降解转化展开了广泛的研究。本文着重介绍以下几个方面的研究进展以及有待解决的问题:

1 纤维素酶系统的组成及其协同作用

纤维素酶是一大类复杂酶系的总称。纤维素降解酶按照其催化功能可分为3大类:外切-β-1,4-葡聚糖酶(exo-β-1,4-glucanases, EC 3.2.1.91),又称为纤维二糖水解酶(Cellobiohydrolases),简称为外切酶(CBH);内切-β-1,4-葡聚糖酶(endo-β-1,4-glucanases, EC 3.2.1.4),简称为内切酶(EG);β-葡萄糖苷酶

(β -1,4-glucosidases, EC 3.2.1.21)。长期的研究表明, 结晶纤维素的彻底降解至少需要这 3 组纤维素酶的协同作用: 外切酶 (纤维二糖水解酶) 可以水解纤维素结晶区, (CBH I) 从纤维素链的还原端或 (CBH II) 非还原端开始持续水解, 释放纤维二糖; 内切葡聚糖主要作用于纤维素的非结晶区, 随机水解纤维素链中的糖苷键, 把纤维素长链切断, 转化成为大量不同聚合度的纤维素短链, 使得纤维素分子的聚合度降低, 可供外切酶作用的纤维素链末端数增加; β -葡萄糖苷酶则主要水解纤维二糖和可溶性纤维寡糖, 最终将纤维素转化为可利用的葡萄糖^[4]。由于天然纤维素材料的组成和结构不同, 其降解所需的纤维素酶不同组分之间, 以及纤维素酶与其他降解酶活力的最适比例也就各不相同, 还难以给出统一的标准。

事实上, 工业用的纤维素酶制剂中还含有许多半纤维素酶, 包括木聚糖酶、木糖苷酶、甘露聚糖酶、甘露糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、阿魏酸酯酶、淀粉酶和蛋白酶等。纤维素酶制剂可以分离纯化出几十种蛋白, 多半都与纤维素降解有关。单一的酶系组分不能独立完成对天然木质纤维素底物的最终降解, 把天然木质纤维素底物降解为葡萄糖等单糖, 必须在几类纤维素酶系组分的共同作用下才能完成。在此理论上, 通过大量的实验验证, 研究者们提出了通过对纤维素酶系组分的重建构以优化降解酶系, 提高对纤维素底物的降解效率、降低酶用量的策略^[4]。纤维素酶系组分的重建构是指在对几种不同来源、不同类型纤维素酶系特征充分了解的基础上, 通过将各种组分按不同比例混和, 调整酶解条件, 以达到对底物有最佳的降解效果的目的。大量的研究证明, 瑞氏木霉生产的纤维素酶虽然含有大量的外切葡聚糖酶, 但是其酶系中的 β -葡萄糖苷酶的活性太低, 从而抑制了它的内切和外切酶的活性, 降低了纤维素的转化率和水解速度。实验证明, 在瑞氏木霉纤维素酶中添加适量的 β -葡萄糖苷酶可以大大提高纤维素酶降解纤维素的效率和速度, 提高葡萄糖转化率^[3]。

另一方面, 天然木质纤维素中存在的半纤维素对于纤维素的降解效率也有着重要的影响。有数据证明在纤维素酶水解过程中, 高浓度的木聚寡糖会抑制纤维素酶的活性。而增加酶系中木聚糖酶和木糖苷酶的

比例可以减少这种抑制, 提高纤维素转化率^[5]。陈洪章等报道了阿魏酸酯酶的添加可以打破汽爆处理后稻秆的半纤维素和木质素之间的部分酯键, 提高了稻秆中纤维素和半纤维素的水解速度^[6]。这些结果说明了在天然木质纤维素的降解过程中, 半纤维素酶和纤维素酶之间发生了协同效应, 促进了纤维素和半纤维素的转化率。

近年来, 诺维信公司的科学家发现在瑞氏木霉纤维素酶中添加少量的 GH61 家族的糖苷酶可以有效地提高玉米秸秆的水解效率。进一步实验证明, 加入占总酶量不到 5% 的 GH61 蛋白可以使水解作用所需纤维素酶用量减少到原来的 1/2。在更长的酶解时间、更高的水解程度以及更多的固体纤维素加量的情况下, 添加 GH61 蛋白使所需要的纤维素酶蛋白用量减少这一现象变得更加明显^[7]。

纤维素酶和某些其他蛋白的协同作用也受到了国内外学术研究的关注。虽然其机理尚不十分明确, 但已经取得的成果表明, 可能存在 2 种机制。一种是某些蛋白的添加增加了纤维素酶对纤维素的“可及性”, 即增加了纤维素酶和基质反应的几率; 另一种是某些蛋白提高了纤维素酶的稳定性, 减少了纤维素酶的失活。纤维素酶和其他蛋白协同作用的机理研究可以为减少纤维素酶用量、提高木质纤维素酶解效率、改良纤维素酶性能提供重要的理论依据, 所以需要进行更深入、更细致地研究。

2 纤维素酶糖化能力的评价

纤维素酶活力有多种表示方法。酶制剂公司常用以高聚合度的纤维素衍生物——羧甲基纤维素 (CMC) 为底物来测定纤维素酶中的内切葡聚糖酶活力。其方法是将羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液与酶液混匀, 50℃ 下反应 30 min, 然后用 DNS 法测定还原糖的生成量, 并以每分钟水解底物产生 1 μ mol 还原糖所需的酶量定义为 1 个活力单位 (IU)。

但是在纤维素降解过程中, 纤维素酶中的内切葡聚糖酶活力并不能真实反映纤维素降解效率。所以, 目前国际上最通用的方法是以 Whatman 1 号滤纸作为底物, 测定能反映多组分纤维素酶的协同作用的滤纸酶活力 (Filter paper assay, FPA)。该方法

的优点有: 1) 该方法底物通用易得; 2) 底物具有合适的纤维素酶解感受性; 3) 该方法程序相对简单, 不需要去除剩余底物。但由于滤纸本身结构并不单一, 分为难水解的结晶区和易水解的非结晶区, 所以其水解过程曲线并非线性。经国际纯粹与应用化学联合会 (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) 确立并公布的方法, 要求 1 h 内从 50 mg 滤纸样品上水解出 2 mg 葡萄糖 (约 4% 滤纸被水解), 以保证纤维素的无定形区与结晶区都发生一定程度的水解, 从而更准确地反映酶的组成和含量。为满足这一要求, 在水解之前必须反复调整纤维素酶浓度, 以恰好达到该水解比率, 因此增加了测定的程序和难度。

值得注意的是, 如前所述, 纤维素酶系中的 β -葡萄糖苷酶活力对木质纤维素的降解速度有着很大的影响, 所以了解纤维素酶系中的 β -葡萄糖苷酶活力也很重要。其酶活力的测定方法一般以具有各种发色或者荧光基团的 β -葡萄糖苷衍生物 (如: pNPG) 为底物, 以每分钟水解底物产生 1 μmol 还原糖或发色基团所需的酶量定义为 1 个活力单位 (IU)。同时, 由于内切酶和外切酶都不能水解纤维二糖, β -葡萄糖苷酶的活力也可以通过水解纤维二糖来测定。由于 β -葡萄糖苷酶活力与滤纸酶活的比率对纤维素降解速率和程度影响很大, 该比率成为纤维素酶制剂质量的重要指标。通常, 该比率应该大于 1。

在实际应用中, 人们依然习惯通过滤纸酶活力与 CMC 酶活力表征纤维素酶制剂的糖化能力, 但是大量的实验证明 CMC 或滤纸酶活力单位很难准确反映纤维素酶对于天然木质纤维素底物的糖化能力。这是因为木质纤维素底物本身和纤维素降解酶都是很复杂的体系, 而滤纸与 CMC 酶活力等酶活单位都是基于纤维素酶与单一较纯底物反应的数据计算出来的。另一方面, 不同底物 (含不同预处理方法和程度) 需要不同的降解酶系组成。采用不同的天然底物得到的纤维素酶糖化能力的结果, 也就很难准确地相互比较。因此, 美国能源部在最近提出的纤维素酶开发计划中, 已经明确指出要针对一种明确的样品 (指定稀酸处理方法处理后的玉米秸

秆), 按照指定方法进行不同纤维素酶糖化能力的比较。为了促进我国纤维素酶和纤维素生物炼制产业的发展, 建议中国也应该制定出一套适合我国国情的、以指定预处理后的天然木质纤维素为底物的纤维素酶通用评价方法。

3 纤维素酶的结构与功能

随着各种测试手段以及分子生物学的进步, 科学家可以深入探讨纤维素酶各个酶组分结构与功能。其中, 由于结晶纤维素的解聚或解链可能是纤维素酶解过程的限速反应步骤, 所以外切酶 (CBH), 特别是 CBH I 是研究的热点之一。

经过多年的研究, 已知纤维二糖水解酶具有 2 个独立的活性结构域: 1 个具有催化功能的结构域 (Catalytic domain, CD), 和 1 个具有结合纤维素功能的结构域 (Cellulose binding domain, CBD, 或者称 Carbohydrate binding module, CBM), 两者之间由一段高度糖基化的连接肽 (Linker) 相连。大量的研究证明, CBH 之所以能够有效地降解结晶纤维素, 产生纤维二糖, 首先是利用 CBD 把 CBH 吸附在结晶纤维素表面, 然后单根葡聚糖链 (纤维素) 快速准确地进入 CD 中带底物结合和催化部位的“隧道”, 纤维二糖被准确地从葡聚糖链上切割下来并被释放出来的同时, CBH 分子沿着葡聚糖链向前滑动 2 个葡萄糖单位^[8]。山东大学王禄山等的研究还表明, CBD 虽然不具备对纤维素的水解活力, 但具有疏解结晶纤维素结构的能力^[9]。2009 年, 日本东京大学副教授五十岚圭日子博士首次将 CBH 降解结晶纤维素的动态过程用高速原子力显微镜直接拍摄下来并进行细致地观察, 发现失去 CBD 的 CBH I 分子的持续降解速度和完整的 CBH I 分子相比并没有很大的差别。并证明, CBH I 分子的滑动是伴随着活性中心的酶水解反应同时进行的, 而 CBD 则利用吸附作用增大了酶分子在底物上的浓度^[10]。虽然大量的研究成果使我们对纤维素酶的作用机制有了更深入的了解, 但是纤维素酶在底物上持续性运动, 并打断分子链间氢键的动力来源仍然是一个谜。而这个谜底的揭示将为我们利用分子改造技术提高酶分子转化效率提供正确的理论指导。因此, CBH 这类经

历亿万年进化而成的高效“分子机器”的作用机理值得我们进行更深入地研究。

4 纤维素酶生产技术

虽然纤维素酶和淀粉酶一样, 都有酶制剂商品出售, 但是对同样的乙醇产量, 纤维素乙醇生产采用纤维素酶的成本是淀粉乙醇淀粉酶成本的 50~200 倍。因此, 目前从酶制剂公司购买纤维素酶商品酶制剂来用于木质纤维素降解产糖, 在经济上无法达到商业化要求。近年来, 许多科学家提出了采用现场生产 (On-site production) 的方式来降低纤维素乙醇生产中纤维素酶成本的办法, 即采用在乙醇工厂中建立纤维素酶车间的方式, 先以工厂中预处理之后的一部分木质纤维素为原料进行有氧的产酶发酵, 当酶活达到峰值或各种酶组分处于最佳组合时, 不经任何处理, 直接将含酶的粗发酵液与新的纤维素原料混合, 进入水解产糖或同步糖化发酵的后续工艺。该工艺的优点在于生产出的粗酶液不需要经过分离、储藏和运输, 从而去掉了移除菌丝、浓缩、调配 (添加蛋白质保护剂、抗菌剂、稳定剂等化学药品)、储存、运输等不必要的高昂成本, 而将粗酶液直接用于下游工艺。由于产酶发酵液中的纤维类成分与酶蛋白有一定吸附作用, 直接使用粗酶液可避免相应分离造成的损失, 有研究表明, 未经过加工的粗酶液和酶制剂商品相比, 有更高的酶水解效率。

纤维素酶现场生产技术的核心是优良的纤维素酶工业生产菌株。目前, 瑞氏木霉是世界上研究和应用最广泛的纤维素酶工业微生物。国际两大酶制剂巨头——诺维信和杰能科公司从美国能源部获得了数千万美元的资助, 在瑞氏木霉的纤维素酶生产研发领域均取得了突出的研究成果, 申请了许多专利保护。我国在该领域的研发是远远落后于国际先进水平的, 所以在今后瑞氏木霉的纤维素酶生产研发过程中, 很可能遭遇专利保护的堡垒。

山东大学曲音波等早于 1979 年就腐烂的纤维素样品中筛选出来一株纤维素酶高产的斜卧青霉 *Penicillium decumbens* 菌株, 是我国具有自主知识产

权的纤维素酶工业菌株, 在国内已经被广泛研究和应用了 30 年。它不仅能分泌比较完整的降解天然木质纤维素的酶系, 而且较瑞氏木霉能产较多的 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶。同时青霉的生长速度明显较木霉快, 其纤维素酶在 50℃ 下具有比木霉更好的热稳定性^[11]。近年来, 斜卧青霉的纤维素酶合成调控相关研究取得了一系列的进展^[12-13]。它的基因组测序工作也已经完成, 基因组解析工作正在有序地进行中。研究中发现, 斜卧青霉基因组中含有纤维素结合结构域 (CBM1) 的降解酶的种类明显高于曲霉和瑞氏木霉 (结果未发表), 显示了该菌酶系光明的应用前景。

经过了长期的育种改良和发酵工艺优化, 斜卧青霉变异菌株的最高滤纸酶活达到了 18.9 FPU/mL, 最高纤维素酶生产速率达到了 160.0 FPU/(h·L) (结果未发表)。通过使用同步糖化发酵和补料分批技术, 我们已经成功地使纤维素乙醇的斜卧青霉纤维素酶用酶量降低到 6.4 FPU/g 纤维素底物, 优于前述国外报道的先进水平。乙醇浓度、得率和纤维素转化率分别达到了 57.6 g/L、25.0% 和 76.8%^[14], 纤维素乙醇生产技术已经具备了一定的经济竞争力。

目前, 能源和环境的压力迫使我国急需将木质纤维素降解产糖技术产业化。我们应该以具有自主知识产权的工业菌株 (如斜卧青霉) 为核心, 借鉴国外成功和失败的经验, 充分考虑中国国情, 发挥原料和人力低成本的优势, 研发出完全拥有自主知识产权的、符合我国国情的木质纤维素降解产糖技术。只有这样, 我国才能在未来的经济发展中把握主动, 促使我国工业向环保型工业转型。

REFERENCES

- [1] Qu YB, Zhu MT, Liu K, *et al.* Studies on cellulosic ethanol production for sustainable supply of liquid fuel in China. *Biotechnol J*, 2006, **1**: 1235-1240.
- [2] Fang X, Shen Y, Zhao J, *et al.* Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China. *Bioresour Technol*, 2010, **101**(13): 4814-4819.
- [3] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, *et al.* Biomass recalcitrance. Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, **315**: 804-807.

- [4] Sanchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv*, 2009, **27**: 185–194.
- [5] Kumar R, Wyman CE. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresour Technol*, 2009, **100**(18): 4203–4213.
- [6] Zeng W, Chen HZ. Synergistic effect of feruloyl esterase and cellulase in hydrolyzation of steam-exploded rice straw. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(1): 49–54.
曾薇, 陈洪章. 阿魏酸酯酶和纤维素酶在水解汽爆稻草中的协同作用. *生物工程学报*, 2009, **25**(1): 49–54.
- [7] Harris P, Rey M, Ding H. Methods for enhancing the degradation or conversion of cellulosic material: US, 7608689. 2009-10-27.
- [8] Ossowski I, Stahlberg J, Koivula A, *et al.* Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Cel7A. A comparison with phanerochaete chrysosporium Cel7D. *J Mol Biol*, 2003, **333**(4): 817–829.
- [9] Wang LS, Zhang YZ, Gao PJ. A novel function for the cellulose binding module of cellobiohydrolase I. *Sci China Ser C: Life Sci*, 2008, **51**(7): 620–629.
- [10] Igarashi K, Koivula A, Wada M, *et al.* High-speed atomic force microscopy visualizes processive movement of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I on crystalline cellulose. *J Biol Chem*, 2009, **284**: 36186–36190.
- [11] Cheng YF, Song X, Qin YB, *et al.* Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10. *J Appl Microbiol*, 2009, **107**(6): 1837–1846.
- [12] Sun XY, Liu ZY, Qu YB, *et al.* The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2008, **146**: 119–128.
- [13] Sun XY, Liu ZY, Zheng K, *et al.* The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enzyme Microb Tech*, 2008, **42**: 560–567.
- [14] Liu K, Lin X, Yue J, *et al.* High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresour Technol*, 2010, **101**: 4952–4958.

JOURNALS.IM.AC.CN